

博士論文(要約)

光駆動性イオン輸送体の構造機能解析と
オプトジェネティクスへの展開

(Structural and functional analyses of light-gated ion transporters,
and the perspective of the development of new optogenetics tools)

平成 25 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

加藤 英明

指導教員 濡木理

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

インターネット公表に関する共著者
全員の許可が得られていないため、本章については、非公開

略語一覽

略語	正式名称
APBS	Adaptive Poisson-Boltzmann Solver
AR3	Archaeorhodopsin-3
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	All-trans retinal
BR	Bacteriorhodopsin
BRIL	Cytochrome b562 RIL mutant
BV	biliverdin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	charge coupled device
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-Hydroxy-1-Propanesulfonate
ChR	channelrhodopsin
CHS	cholesteryl hemisuccinate
CRBP	cellular retinol binding protein
DAG	diacylglycerol
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside
DME	dimethyl ether
DMPC	dimyristoylphosphatidylcholine (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
DOPC	dioleoylphosphatidylcholine (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
eBR	enhanced bacteriorhodopsin
ECL	extracellular loop
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EPR	electron paramagnetic resonance
FSEC	Fluorescence-detection size-exclusion chromatography
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G-protein coupled receptor

HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HEK	human embryonic kidney
Hg	hydrargyrum
hR	halorhodopsin
ICL	intracellular loop
IFP	infrared fluorescent protein
IP3	inositol triphosphate
IR	infrared spectroscopy
KR2	krokinobacter rhodopsin 2
LB	Luria Bertani
LCP	lipidic cubic phase
LOV	Light-Oxygen-Voltage-sensing
Mac	rhodopsin from <i>Leptoshaeria maculans</i>
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid
MME	monomethyl ether
MO	monoolein
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NpHR	Halorhodopsin from <i>Natronomonas</i>
PBS	phosphate buffer saline
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
pR	proteorhodopsin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis
Se	selenium
SeMet	selenomethionine
Sf	Spodoptera frugiperda
SFO	step function opsin
SR	sensory rhodopsin
SSFO	stabilized step function opsin
TEV	tobacco etch virus
TM	transmembrane
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
T4L	T4 lysozyme
VSOP	voltage sensor only protein
XAFS	X-ray absorption fine structure

アミノ酸略称一覧

一文字略称	三文字略称	正式名称	一文字略称	三文字略称	正式名称
A	Ala	alanine	M	Met	methionine
C	Cys	cysteine	N	Asn	asparagine
D	Asp	aspartic acid	P	Pro	proline
E	Glu	glutamic acid	Q	Gln	glutamine
F	Phe	phenylalanine	R	Arg	arginine
G	Gly	glycine	S	Ser	serine
H	His	histidine	T	Thr	threonine
I	Ile	isoleucine	V	Val	valine
K	Lys	lysine	W	Trp	tryptophan
L	Leu	leucine	Y	Tyr	tyrosine

序

“An experiment is a device to make Nature speak intelligibly.” ~George Wald~

1. 膜輸送体

生命の基本単位である細胞は、疎水性の脂質膜（生体膜）によって自身とそれ以外の環境を物理的に区別している。そのため、細胞は自身の生命活動を維持するために、各種イオン、アミノ酸、糖、脂肪酸やビタミンといった低分子化合物などを、必要に応じて取り込み／排出を行う必要がある。こうした役割を担っているのが生体膜上に埋め込まれた輸送体タンパク質、すなわち膜輸送体である。膜輸送体は、その輸送の駆動力の種類によって「受動輸送を行うチャネル」と「能動輸送を行うポンプ」に大別されるが、どちらの輸送体も「必要な時に必要な量だけ」「輸送する物質（基質）を正確に選択して」輸送する必要があるという点で共通している。膜輸送体の作動機構を考える上で最も重要な性質であるこの「輸送制御」と「基質選択」のメカニズムを明らかにするためには、輸送体タンパク質の立体構造を手に入れることが不可欠であると考えられる。しかし、膜輸送体を含む膜タンパク質は一般的に試料調製が難しく得られた試料も不安定であることが多かったため、1958年に John Kendrew 博士、Max Perutz 博士が初めてタンパク質（ミオグロビン）の X 線構造解析に成功してから^{1,2}、膜タンパク質の立体構造が決定されるまでには長い年月が必要となった。1982年、Hartmut Michel 博士らが初めて膜タンパク質（光合成反応中心）の結晶構造解析に成功し³、1997年には Ehud Landau 博士らがポンプ（H⁺ポンプであるバクテリオロドプシン（BR））の構造解析に⁴、1998年には Roderick MacKinnon 博士らがチャネル（K⁺チャネル）の構造解析に成

功した^{5,6}。その後様々な知識の蓄積や技術革新を経て、現在までに多種多様の膜輸送体の立体構造が決定されてきている。しかし、膜輸送体の駆動力、基質選択性、輸送制御のメカニズムは同じファミリー内の輸送体であってもそれぞれ異なっていることが多く^{7,8}、輸送体の作動機構に関する統一的な理解は未だ得られていないというのが現状である。

2. ロドプシンファミリー

膜輸送体や膜受容体のような膜タンパク質は、様々な刺激を駆動力として基質の輸送やシグナルの伝達を行うが、そうした駆動力の1つに”光”がある。ヒトから微生物まで殆どの生物は光を受容し、その光情報に応じた行動をとるが、多くの場合この光情報の受容はロドプシンファミリータンパク質によって担われている。ロドプシンファミリータンパク質は7回の膜貫通ヘリックス(TM)からなる膜タンパク質であり、発色団としてレチナールと呼ばれる低分子が共有結合をしているという構造的特徴を持つ。ロドプシンファミリータンパク質の研究は古くから行われており、その歴史は1876年に Franz Boll 博士がカエル網膜に存在する光感受性色素を発見し⁹、翌年1877年に Willy Kuhne 博士が胆汁酸を用いてこの色素を単離することに成功、”ロドプシン”と命名したところに端を発する。その後約140年の間に様々なロドプシンファミリータンパク質が発見され、現在ではその一次配列の違いから、タイプIロドプシン(微生物型ロドプシン)とタイプIIロドプシン(動物型ロドプシン)というサブファミリーに分類され、研究されている。微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンでは、一次配列のみならず立体構造も非常に異なっており、また、後者のロドプシンは多くがGタンパク質共役型受容体(GPCR)として働くのと対照的に、前者はH⁺ポンプ、Cl⁻ポンプ、Na⁺ポンプ、陽イオンチャネル、センサーと非常に多岐に渡る機能を持つことが知られている(図p-1)^{7,10}。そのため、両者はどちらも7回膜貫通ドメインを持ち、7番目の膜貫通ヘリックス(TM)のLys残基とレチナールがシッフ塩基を介して共有結合しているという点で共通しているにも関わらず、進化的に共通の祖先を持たない収斂進化の関係にあると考えられてきた^{11,12}。しかし近年、動物型ロドプシンと微生物型ロドプシンで共通している7本のTMの並び順には機能的な必然性が無いこと¹³、レチナールがTM7のLys残基と結合していることに機能的な必然性が無いことが報告され¹⁴、微生物型ロドプシンの構造を持ちながら動物型ロドプシンと同じ型のレチナール分子を結合しているロドプシン(ミドルロドプシン)が発見されたこと等から¹⁵、両者の進化的関係は再考されつつある。

3. 微生物型ロドプシン

1876年に初の動物型ロドプシンが発見された事と比較すると、微生物型ロドプシンの歴史は比較的新しい。しかしその歴史は、”細胞膜がどのような構造を取っているか”ということすら定かではなかった

1960年代にまで遡る。1960年代当時、細胞膜の構造に関しては大きく二つの仮説¹⁶、すなわち”bilayer model”(二層に重なった脂質の更に外側を球状のタンパク質が覆っているというモデルであり、当時は Davson-Danielli モデルとも呼ばれていた。後の流動モザイクモデルの元となっている)と”lipoprotein subunit model”(コイル状タンパク質に脂質分子が複数ささった粒子状の lipoprotein を構成単位とし、それが複数寄り集まることで細胞膜が形成されるという仮説。Bilayer model との最も大きな違いは連続的な脂質二重層を必要とするかどうかにある)が提唱されていた。当時、赤血球影を用いて細胞膜の研究を行っていた顕微鏡学者の Walther Stoeckenius 博士は、1963年に Brown 博士より発表された”高度好塩菌 *Halobacterium halobium* は、周囲の塩濃度が低下すると、その細胞膜が均一なサイズかつ同質の超分子複合体に分裂する”という lipoprotein subunit モデルを支持する論文を読み¹⁷、Brown 博士の報告を検証するため同細菌の研究を開始した。Bob Rowen 博士との共同実験の結果、Stoeckenius 博士はまもなく”Brown 博士が指摘した同一サイズの超分子複合体は細胞膜の一部では無く、lipoprotein subunit モデルを支持する結果では無い”と結論づけたが¹⁸、低塩濃度条件下において同細菌の細胞膜が異なる組成、異なるサイズの膜画分に分離することは事実であったため、そうした膜画分に存在するであろう機能的複合体を調べるために博士は同細菌の研究を続けた。当時 Stoeckenius 研で博士研究員として働いていた Wolf Kunau 博士が紫色の膜画分を単離・精製し、”紫膜”(purple membrane)と命名したのはこの当時のことである¹⁹。紫膜が単離されて程なく Stoeckenius 研に博士研究員として訪れた Allen Blaurock 博士と Dieter Oesterhelt 博士は、X線解析と生化学的解析を組み合わせることで、紫膜がレチナルを含む26 kDaのタンパク質からなることを発見し^{20,21}、このタンパク質は1973年にバクテリオロドプシン(BR)と名付けられた²²。Oesterhelt 博士、Stoeckenius 博士によって、BR が光エネルギーを利用して細胞内から細胞外へ H⁺ をくみ出すポンプとして働くことが明らかになり²³、その2年後には Richard Henderson 博士、Nigel Unwin 博士によって、電子顕微鏡法により膜タンパク質としては初めてその立体構造(6.5 Å 分解能)が明らかになると²⁴、以後 BR は、簡便に精製可能であり、その生化学的性質、立体構造までが知られている当時唯一の膜タンパク質として膜タンパク質研究のプロトタイプとなり、同研究分野をリードしてきた²⁵⁻³⁰。現在では、BR はその分子メカニズムに関する基礎研究が最も良く知られている膜タンパク質の1つというだけでは無く、水素燃料の触媒やホログラムメモリの材料としても利用される等、工業的応用研究が最も盛んな膜タンパク質の1つとしても名高い³¹⁻³⁴。

BR の発見から6年後の1977年、大阪大学の向畑恭男博士らは、紫膜を持たない別株の *Halobacterium halobium* に光を照射すると、BR とは逆に細胞内の pH が増加する現象を発見し、この現象に従来の BR とは異なるロドプシンが関与していることを見出した³⁵。このロドプシンは後に”ハロロドプシン”(hR)と命名され、Brigitte Schobert 博士、Janos Lanyi 博士によって、このタンパク質が BR とは異なり細胞内に

Cl⁻ イオンを取り込む Cl⁻ ポンプとして働いていることが見出される³⁶。また、1982、85年には、視物質ロドプシンと同様、光情報を細胞内タンパク質の活性化へと変換するセンサリーロドプシン I, II (SRI, SRII) が発見され^{37,38}、微生物型ロドプシンは動物型ロドプシンと比較して多様な機能を有していることが徐々に認知されるようになった。その後も、1999年には”真核生物からの初の微生物型ロドプシン”として *Neurospora rhodopsin* が発見され³⁹、2000年には”真正細菌 (海洋微生物) から初の微生物型ロドプシン”としてプロテオロドプシン (pR) が発見されるなど⁴⁰ 微生物型ロドプシンの世界は更なる広がりを見せてきたが、本研究分野の進展において1つの契機となったのが陽イオンチャネルとして働くチャネルロドプシン (ChR) の発見と、それに伴うオプトジェネティクス技術の確立であった。

4. オプトジェネティクス (光遺伝学)

オプトジェネティクスとは、2006年に米国スタンフォード大学の Karl Deisseroth 博士によって名付けられた”光タンパク質と遺伝学を組み合わせることで、目的の細胞や個体の性質をコントロールする技術”のことを指す⁴¹。オプトジェネティクスの黎明期から現在まで、もっとも良く用いられている光タンパク質が ChR であり、その発端は2002年の ChR の発見に遡る。

2002、3年に初の光駆動性陽イオンチャネルである ChR1, 2 が発見されると^{42,43}、多くの研究者がこのタンパク質を用いて、標的細胞の膜電位を、特に神経細胞の膜電位をコントロールすることを考えた。光によって神経細胞を脱分極させられるということは、光によって目的の神経細胞を任意のタイミングで興奮させ、ひいてはその機能を解析出来ることを意味する。実際 ChR1 の発見が報告された論文において”... the use of ChR1 as a tool for measuring and/or manipulating electrical and proton gradients across cell membranes, simply by illumination.”と記述されていることから分かるように⁴²、元々 *Chlamydomonas* において走光性に関わっているこのタンパク質を”膜電位を操作するためのツール”として用いるというアイディアは、2002年当時から既に存在していたようである。そして、2005年から2006年にかけて、Hegemann 博士、Nagel 博士らのアドバイスを受けながら培養神経細胞や線虫を用いて初めてこの実験に成功したのは、スタンフォード大学 Deisseroth 博士ら、ルール大学 Stefan Herlitze 博士ら、ヨハン・ヴォルフガング・ゲーテ大学 Alexander Gottschalk 博士ら、ウェイン州立大学 Zhuo-Hua Pan 博士ら、東北大学八尾寛博士らの5つのグループであった⁴⁴⁻⁴⁸。そして翌年2007年には、Deisseroth 博士らのグループが ChR と光ファイバーを組み合わせることによって、生きたマウスの行動 (この場合は睡眠覚醒行動) を光によって制御することに成功する⁴⁹。非常に高い空間分解能、時間分解能をもって可逆的に神経細胞の活動をコントロール出来るオプトジェネティクス技術は非常に高い評価を受け、以後、ChR を用いた各種神経回路の解析に関する論文は増加の一途を辿ってきた⁵⁰。同技術は2011年には *Nature Methods* 誌により”Methods of the Year 2010”

に選出されるに至り⁵⁰，今やオプトジェネティクス技術は神経回路研究という基礎研究のみならず⁵¹⁻⁵³，疾患治療の理論的研究や^{54,55}，疾患治療そのものへの応用を目指して使用されつつある⁵⁶．また，ChRを用いたオプトジェネティクス技術は脳科学分野のみならず心臓血管分野でも注目を集めており，2010年にはChRを用いて心臓の拍動をコントロールすることに成功，ChRを用いたペースメーカーの開発も行われている^{57,58}．

ここで一つ付け加えておかなければならないのは，オプトジェネティクス技術はChRのみに留まるものではないということである．2007年には，Deisseroth博士らのグループがCl⁻ポンプ型微生物ロドプシンであるhR (NpHR)を用いて神経細胞の興奮を抑制することに成功⁵⁹，続く2010年にはマサチューセッツ工科大学Edward Boyden博士らのグループがH⁺ポンプ型微生物ロドプシンであるアーキロドプシン3 (AR3)，*Leptospira maculans*由来H⁺ポンプ型微生物ロドプシン (Mac)を用いて神経の興奮抑制に成功した⁶⁰．また2009年にはDeisseroth博士らのグループがChRと他のGPCRを融合させることで，光照射によって異なる3量体Gタンパク質とカップルしたシグナル経路を活性化させ，環状AMP (cAMP)，イノシトール3リン酸 (IP3)，ジアシルグリセロール (DAG)と言ったセカンドメッセンジャーの産生を亢進させることに可能にしている⁶¹．ノースカロライナ大学チャペルヒル校Klaus Hahn博士らはオプトジェネティクス技術を微生物型ロドプシンの輪から更に進展させ，微生物ロドプシンとは別の光タンパク質であるフォトトロピンのLight-Oxygen-Voltage-sensing domain (LOVドメイン)を利用し，光によって遺伝子発現制御をコントロールするツール，photoactivatable-Rac (PA-Rac), PA-RhoA, PA-Cdc42等を作製，報告している⁶²．他方ハーバード大学Adam Cohen博士らのグループは，従来のオプトジェネティクス技術を再度見直すことで，微生物型ロドプシンを用いて逆に神経細胞上の電位変化をモニターするインジケータを作製することに成功している⁶³．このように，オプトジェネティクスとは，既にその地位を確立した技術でありながら，今なお驚くべき勢いで広がりを見せているとって過言では無い．

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

【 参 考 文 献 】

- 1 Kendrew, J. C. Architecture of a protein molecule. *Nature* **182**, 764-767 (1958).
- 2 Kendrew, J. C. *et al.* A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662-666 (1958).
- 3 Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3A resolution. *Nature* **318**, 618-624 (1985).
- 4 Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P. & Landau, E. M. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* **277**, 1676-1681 (1997).
- 5 Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77 (1998).
- 6 MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A. & Chait, B. T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**, 106-109 (1998).
- 7 Kouyama, T. & Murakami, M. Structural divergence and functional versatility of the rhodopsin superfamily. *Photochem Photobiol Sci* **9**, 1458-1465, doi:10.1039/c0pp00236d (2010).
- 8 Yan, N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 151-159, doi:10.1016/j.tibs.2013.01.003 (2013).
- 9 Boll, F. Zur Anatomie und Physiologie der Retina. *Monatsber. Akad. Wissensch. Berlin.*, 783-787 (1876).
- 10 Klare, J. P., Chizhov, I. & Engelhard, M. Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors. *Results Probl. Cell Differ.* **45**, 73-122, doi:10.1007/400_2007_041 (2008).
- 11 Spudich, J. L., Yang, C. S., Jung, K. H. & Spudich, E. N. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 365-392, doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.365 (2000).
- 12 Soppa, J. Two hypotheses--one answer. Sequence comparison does not support an evolutionary link between halobacterial retinal proteins including bacteriorhodopsin and eukaryotic G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **342**, 7-11 (1994).
- 13 Mackin, K. A., Roy, R. A. & Theobald, D. L. An Empirical Test of Convergent Evolution in Rhodopsins. *Mol. Biol. Evol.*, doi:10.1093/molbev/mst171 (2013).
- 14 Devine, E. L., Oprian, D. D. & Theobald, D. L. Relocating the active-site lysine in rhodopsin and implications for evolution of retinylidene proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13351-13355, doi:10.1073/pnas.1306826110 (2013).
- 15 Sudo, Y. *et al.* A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties. *The Journal of biological chemistry* **286**, 5967-5976, doi:10.1074/jbc.M110.190058 (2011).
- 16 Stoeckenius, W. & Engelman, D. M. Current models for the structure of biological membranes. *The Journal of cell biology* **42**, 613-646 (1969).
- 17 Brown, A. D. The Peripheral Structures of Gram-Negative Bacteria.Iv. The Cation-Sensitive Dissolution of the Cell Membrane of the Halophilic Bacterium, *Halobacterium Halobium*. *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 425-435 (1963).
- 18 Stoeckenius, W. & Rowen, R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *The Journal of cell biology* **34**, 365-393 (1967).
- 19 Stoeckenius, W. & Kunau, W. H. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *The Journal of cell biology* **38**, 337-357 (1968).
- 20 Blaurock, A. E. & Stoeckenius, W. Structure of the purple membrane. *Nat New Biol* **233**, 152-155 (1971).

- 21 Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium
halobium. *Nat New Biol* **233**, 149-152 (1971).
- 22 Kushwaha, S. C. & Kates, M. Isolation and identification of "bacteriorhodopsin" and minor C40-carotenoids
in Halobacterium cutirubrum. *Biochim. Biophys. Acta* **316**, 235-243 (1973).
- 23 Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
70, 2853-2857 (1973).
- 24 Henderson, R. & Unwin, P. N. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron
microscopy. *Nature* **257**, 28-32 (1975).
- 25 Hirai, T., Subramaniam, S. & Lanyi, J. K. Structural snapshots of conformational changes in a seven-helix
membrane protein: lessons from bacteriorhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 433-439,
doi:10.1016/j.sbi.2009.07.009 (2009).
- 26 Engel, A. & Gaub, H. E. Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 127-148,
doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.154450 (2008).
- 27 Popot, J. L. & Saraste, M. Engineering membrane proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 394-402 (1995).
- 28 Heymann, J. B., Muller, D. J., Mitsuoka, K. & Engel, A. Electron and atomic force microscopy of
membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 543-549 (1997).
- 29 Booth, P. J. & Curran, A. R. Membrane protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 115-121 (1999).
- 30 Gerwert, K. Molecular reaction mechanisms of proteins monitored by time-resolved FTIR-spectroscopy.
Biol. Chem. **380**, 931-935, doi:10.1515/BC.1999.115 (1999).
- 31 Saeedi, P. *et al.* Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered* **3**, 326-328,
doi:10.4161/bioe.21445 (2012).
- 32 Trivedi, S., Choudhary, O. P. & Gharu, J. Different proposed applications of bacteriorhodopsin. *Recent*
patents on DNA & gene sequences **5**, 35-40 (2011).
- 33 Gruner, G. Carbon nanotube transistors for biosensing applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 322-335,
doi:10.1007/s00216-005-3400-4 (2006).
- 34 Wise, K. J., Gillespie, N. B., Stuart, J. A., Krebs, M. P. & Birge, R. R. Optimization of bacteriorhodopsin for
bioelectronic devices. *Trends Biotechnol.* **20**, 387-394 (2002).
- 35 Matsuno-Yagi, A. & Mukohata, Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains
of Halobacterium halobium differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 237-243 (1977).
- 36 Schobert, B. & Lanyi, J. K. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *The Journal of biological*
chemistry **257**, 10306-10313 (1982).
- 37 Bogomolni, R. A. & Spudich, J. L. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic
Halobacterium halobium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 6250-6254 (1982).
- 38 Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N. & Kobatake, Y. A photosystem other than PS370 also mediates the
negative phototaxis of Halobacterium halobium. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 161-164 (1985).
- 39 Bieszke, J. A. *et al.* The nop-1 gene of Neurospora crassa encodes a seven transmembrane helix
retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8034-8039
(1999).
- 40 Beja, O. *et al.* Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**,
1902-1906 (2000).
- 41 Deisseroth, K. *et al.* Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits.
The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **26**, 10380-10386,
doi:10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006 (2006).
- 42 Nagel, G. *et al.* Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395-2398,
doi:10.1126/science.1072068 (2002).

- 43 Nagel, G. *et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13940-13945, doi:10.1073/pnas.1936192100 (2003).
- 44 Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* **8**, 1263-1268, doi:10.1038/nn1525 (2005).
- 45 Li, X. *et al.* Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17816-17821, doi:10.1073/pnas.0509030102 (2005).
- 46 Nagel, G. *et al.* Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current biology : CB* **15**, 2279-2284, doi:10.1016/j.cub.2005.11.032 (2005).
- 47 Bi, A. *et al.* Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* **50**, 23-33, doi:10.1016/j.neuron.2006.02.026 (2006).
- 48 Ishizuka, T., Kakuda, M., Araki, R. & Yawo, H. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci. Res.* **54**, 85-94, doi:10.1016/j.neures.2005.10.009 (2006).
- 49 Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K. & de Lecea, L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* **450**, 420-424, doi:10.1038/nature06310 (2007).
- 50 Deisseroth, K. Optogenetics. *Nat. Methods* **8**, 26-29, doi:10.1038/nmeth.f.324 (2011).
- 51 Huber, D. *et al.* Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* **451**, 61-64, doi:10.1038/nature06445 (2008).
- 52 Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* **459**, 698-702, doi:10.1038/nature07991 (2009).
- 53 Tsai, H. C. *et al.* Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* **324**, 1080-1084, doi:10.1126/science.1168878 (2009).
- 54 Kravitz, A. V. *et al.* Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* **466**, 622-626, doi:10.1038/nature09159 (2010).
- 55 Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K. R., Henderson, J. M. & Deisseroth, K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* **324**, 354-359, doi:10.1126/science.1167093 (2009).
- 56 Ji, Z. G., Ishizuka, T. & Yawo, H. Channelrhodopsins-Their potential in gene therapy for neurological disorders. *Neurosci. Res.*, doi:10.1016/j.neures.2012.09.004 (2012).
- 57 Arrenberg, A. B., Stainier, D. Y., Baier, H. & Huisken, J. Optogenetic control of cardiac function. *Science* **330**, 971-974, doi:10.1126/science.1195929 (2010).
- 58 Entcheva, E. Cardiac optogenetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**, H1179-1191, doi:10.1152/ajpheart.00432.2012 (2013).
- 59 Zhang, F. *et al.* Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**, 633-639, doi:10.1038/nature05744 (2007).
- 60 Chow, B. Y. *et al.* High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* **463**, 98-102, doi:10.1038/nature08652 (2010).
- 61 Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H. & Deisseroth, K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* **458**, 1025-1029, doi:10.1038/nature07926 (2009).
- 62 Wu, Y. I. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* **461**, 104-108, doi:10.1038/nature08241 (2009).
- 63 Kralj, J. M., Douglass, A. D., Hochbaum, D. R., Maclaurin, D. & Cohen, A. E. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nat. Methods* **9**, 90-95, doi:10.1038/nmeth.1782 (2012).

- 64 Famintzin, A. Die Wirkung des Lichtes auf Algen und einige andere ihnen nahe verwandte Organismen. *Jahrb f wiss Botank VI*. (1878).
- 65 Mast, S. O. The process of orientation in the colonial organism, *Gonium pectorale*, and a study of the structure and function of the eye-spot. *J. Exp. Zool.* **20**, 1–17 (1916).
- 66 Schmidt, J. A. & Eckert, R. Calcium couples flagellar reversal to photostimulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* **262**, 713-715 (1976).
- 67 Litvin, F. F., Sineshchekov, O. A. & Sineshchekov, V. A. Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*. *Nature* **271**, 476-478 (1978).
- 68 Foster, K. W. & Smyth, R. D. Light Antennas in phototactic algae. *Microbiol. Rev.* **44**, 572-630 (1980).
- 69 Foster, K. W. *et al.* A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* **311**, 756-759 (1984).
- 70 Braun, F. J. & Hegemann, P. Direct measurement of cytosolic calcium and pH in living *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 199-208, doi:10.1016/S0171-9335(99)80099-5 (1999).
- 71 Nagel, G., Mockel, B., Buldt, G. & Bamberg, E. Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS Lett.* **377**, 263-266 (1995).
- 72 Schmies, G., Engelhard, M., Wood, P. G., Nagel, G. & Bamberg, E. Electrophysiological characterization of specific interactions between bacterial sensory rhodopsins and their transducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1555-1559, doi:10.1073/pnas.031562298 (2001).
- 73 Berthold, P. *et al.* Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *The Plant cell* **20**, 1665-1677, doi:10.1105/tpc.108.057919 (2008).
- 74 Zhang, F. *et al.* Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* **11**, 631-633, doi:10.1038/nn.2120 (2008).
- 75 Hou, S. Y. *et al.* Diversity of *Chlamydomonas* channelrhodopsins. *Photochem. Photobiol.* **88**, 119-128, doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01027.x (2012).
- 76 Govorunova, E. G., Spudich, E. N., Lane, C. E., Sineshchekov, O. A. & Spudich, J. L. New channelrhodopsin with a red-shifted spectrum and rapid kinetics from *Mesostigma viride*. *mBio* **2**, e00115-00111, doi:10.1128/mBio.00115-11 (2011).
- 77 Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Janz, R. & Spudich, J. L. Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*. *The Journal of biological chemistry* **288**, 29911-29922, doi:10.1074/jbc.M113.505495 (2013).
- 78 Kianianmomeni, A., Stehfest, K., Nematollahi, G., Hegemann, P. & Hallmann, A. Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol.* **151**, 347-366, doi:10.1104/pp.109.143297 (2009).
- 79 Nagel, G. *et al.* Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 863-866, doi:10.1042/BST0330863 (2005).
- 80 Ritter, E., Stehfest, K., Berndt, A., Hegemann, P. & Bartl, F. J. Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* **283**, 35033-35041, doi:10.1074/jbc.M806353200 (2008).
- 81 Stehfest, K. & Hegemann, P. Evolution of the channelrhodopsin photocycle model. *Chemphyschem* **11**, 1120-1126, doi:10.1002/cphc.200900980 (2010).
- 82 Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. & Bamberg, E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 267-278, doi:10.1021/bi901634p (2010).
- 83 Neumann-Verhoeven, M. K. *et al.* Ultrafast infrared spectroscopy on channelrhodopsin-2 reveals efficient

- energy transfer from the retinal chromophore to the protein. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6968-6976, doi:10.1021/ja400554y (2013).
- 84 Verhoefen, M. K. *et al.* The photocycle of channelrhodopsin-2: ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps. *Chemphyschem* **11**, 3113-3122, doi:10.1002/cphc.201000181 (2010).
- 85 Stehfest, K., Ritter, E., Berndt, A., Bartl, F. & Hegemann, P. The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *J. Mol. Biol.* **398**, 690-702, doi:10.1016/j.jmb.2010.03.031 (2010).
- 86 Ritter, E., Piwowarski, P., Hegemann, P. & Bartl, F. J. Light-dark adaptation of channelrhodopsin C128T mutant. *The Journal of biological chemistry* **288**, 10451-10458, doi:10.1074/jbc.M112.446427 (2013).
- 87 Yizhar, O. *et al.* Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**, 171-178, doi:10.1038/nature10360 (2011).
- 88 Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L. A., Hegemann, P. & Deisseroth, K. Bi-stable neural state switches. *Nat. Neurosci.* **12**, 229-234, doi:10.1038/nn.2247 (2009).
- 89 Nack, M. *et al.* The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochem Photobiol Sci* **9**, 194-198, doi:10.1039/b9pp00157c (2010).
- 90 Muller, M., Bamann, C., Bamberg, E. & Kuhlbrandt, W. Projection structure of channelrhodopsin-2 at 6 Å resolution by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* **414**, 86-95, doi:10.1016/j.jmb.2011.09.049 (2011).
- 91 Sugiyama, Y. *et al.* Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2. *Photochem Photobiol Sci* **8**, 328-336, doi:10.1039/b815762f (2009).
- 92 Ruffert, K. *et al.* Glutamate residue 90 in the predicted transmembrane domain 2 is crucial for cation flux through channelrhodopsin 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 737-743, doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.024 (2011).
- 93 Ward, J. J., McGuffin, L. J., Bryson, K., Buxton, B. F. & Jones, D. T. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* **20**, 2138-2139, doi:10.1093/bioinformatics/bth195 (2004).
- 94 von Heijne, G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**, 487-494 (1992).
- 95 Kawate, T. & Gouaux, E. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure* **14**, 673-681, doi:10.1016/j.str.2006.01.013 (2006).
- 96 Jestin, J. L., Volioti, G. & Winter, G. Improving the display of proteins on filamentous phage. *Res. Microbiol.* **152**, 187-191 (2001).
- 97 Fekkes, P. & Driessen, A. J. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **63**, 161-173 (1999).
- 98 Brake, A. J. *et al.* Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4642-4646 (1984).
- 99 Lin, J. Y., Lin, M. Z., Steinbach, P. & Tsien, R. Y. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys. J.* **96**, 1803-1814, doi:10.1016/j.bpj.2008.11.034 (2009).
- 100 Landau, E. M. & Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14532-14535 (1996).
- 101 Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265, doi:10.1126/science.1150577 (2007).
- 102 Rosenbaum, D. M. *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266-1273, doi:10.1126/science.1150609 (2007).
- 103 Caffrey, M., Li, D. & Dukupati, A. Membrane protein structure determination using crystallography and lipidic mesophases: recent advances and successes. *Biochemistry (Mosc)*. **51**, 6266-6288, doi:10.1021/bi300010w (2012).
- 104 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132, doi:10.1107/S0907444909047337 (2010).

- 105 Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol*
106 *Crystallogr* **67**, 235-242, doi:10.1107/S0907444910045749 (2011).
- 107 Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta crystallographica. Section A, Foundations of*
108 *crystallography* **64**, 112-122, doi:10.1107/S0108767307043930 (2008).
- 109 Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.
110 *Nat Protoc* **4**, 363-371, doi:10.1038/nprot.2009.2 (2009).
- 111 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.
112 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 113 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D*
114 *Biol Crystallogr* **66**, 486-501, doi:10.1107/S0907444910007493 (2010).
- 115 Dolinsky, T. J. *et al.* PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures
116 for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* **35**, W522-525, doi:10.1093/nar/gkm276 (2007).
- 117 Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems:
118 application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10037-10041,
doi:10.1073/pnas.181342398 (2001).
- 119 Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain
120 configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99 (1963).
- 121 Hoffmann, J. *et al.* Studying the stoichiometries of membrane proteins by mass spectrometry: microbial
122 rhodopsins and a potassium ion channel. *Phys Chem Chem Phys* **12**, 3480-3485 (2010).
- 123 Lanyi, J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1012-1018,
124 doi:10.1016/j.bbabi.2005.11.003 (2006).
- 125 Jiang, Y. *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33-41,
126 doi:10.1038/nature01580 (2003).
- 127 Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium
128 channel. *Nature* **475**, 353-358, doi:10.1038/nature10238 (2011).
- 129 Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M. & Long, S. B. Crystal structure of the calcium release-activated calcium
130 channel Orai. *Science* **338**, 1308-1313, doi:10.1126/science.1228757 (2012).
- 131 Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. X-ray structure of a Cl⁻ chloride
132 channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287-294, doi:10.1038/415287a
(2002).
- 133 Tombola, F., Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y. The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each
134 controlled by one voltage sensor. *Neuron* **58**, 546-556, doi:10.1016/j.neuron.2008.03.026 (2008).
- 135 Koch, H. P. *et al.* Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**,
136 9111-9116, doi:10.1073/pnas.0801553105 (2008).
- 137 Li, H., Robertson, A. D. & Jensen, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a
138 values. *Proteins* **61**, 704-721, doi:10.1002/prot.20660 (2005).
- 139 Eisenhauer, K. *et al.* In channelrhodopsin-2 Glu-90 is crucial for ion selectivity and is deprotonated during
140 the photocycle. *The Journal of biological chemistry* **287**, 6904-6911, doi:10.1074/jbc.M111.327700 (2012).
- 141 Lorenz-Fonfria, V. A. *et al.* Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to
142 channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E1273-1281, doi:10.1073/pnas.1219502110 (2013).
- 143 Tanimoto, S., Sugiyama, Y., Takahashi, T., Ishizuka, T. & Yawo, H. Involvement of glutamate 97 in ion
144 influx through photo-activated channelrhodopsin-2. *Neurosci. Res.*, doi:10.1016/j.neures.2012.05.008 (2012).
- 145 Richards, R. & Dempski, R. E. Re-introduction of transmembrane serine residues reduce the minimum pore
146 diameter of channelrhodopsin-2. *PLoS One* **7**, e50018, doi:10.1371/journal.pone.0050018 (2012).
- 147 Gaiko, O. & Dempski, R. E. Transmembrane domain three contributes to the ion conductance pathway of

- channelrhodopsin-2. *Biophys. J.* **104**, 1230-1237, doi:10.1016/j.bpj.2013.02.013 (2013).
- 127 Watanabe, H. C., Welke, K., Sindhikara, D. J., Hegemann, P. & Elstner, M. Towards an understanding of
channelrhodopsin function: simulations lead to novel insights of the channel mechanism. *J. Mol. Biol.* **425**,
1795-1814, doi:10.1016/j.jmb.2013.01.033 (2013).
- 128 Sattig, T., Rickert, C., Bamberg, E., Steinhoff, H. J. & Bamann, C. Light-induced movement of the
transmembrane helix B in channelrhodopsin-2. *Angewandte Chemie* **52**, 9705-9708,
doi:10.1002/anie.201301698 (2013).
- 129 Krause, N., Engelhard, C., Heberle, J., Schlesinger, R. & Bittl, R. Structural differences between the closed
and open states of channelrhodopsin-2 as observed by EPR spectroscopy. *FEBS Lett.* **587**, 3309-3313,
doi:10.1016/j.febslet.2013.08.043 (2013).
- 130 Zhang, F. *et al.* The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell* **147**, 1446-1457,
doi:10.1016/j.cell.2011.12.004 (2011).
- 131 Berndt, A. *et al.* High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc.*
Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**, 7595-7600, doi:10.1073/pnas.1017210108 (2011).
- 132 Kleinlogel, S. *et al.* Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca(2)+-permeable
channelrhodopsin CatCh. *Nat. Neurosci.* **14**, 513-518, doi:10.1038/nn.2776 (2011).
- 133 Wang, H. *et al.* Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins
from chlamydomonas. *The Journal of biological chemistry* **284**, 5685-5696, doi:10.1074/jbc.M807632200
(2009).
- 134 Prigge, M. *et al.* Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics. *The Journal of biological*
chemistry **287**, 31804-31812, doi:10.1074/jbc.M112.391185 (2012).
- 135 Hegemann, P. & Moglich, A. Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nat.*
Methods **8**, 39-42, doi:10.1038/nmeth.f.327 (2011).
- 136 Shu, X. *et al.* Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial
phytochrome. *Science* **324**, 804-807, doi:10.1126/science.1168683 (2009).
- 137 Wang, W. *et al.* Tuning the electronic absorption of protein-embedded all-trans-retinal. *Science* **338**,
1340-1343, doi:10.1126/science.1226135 (2012).
- 138 Baasov, T. & Sheves, M. Model compounds for the study of spectroscopic properties of visual pigments and
bacteriorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7524-7533 (1985).
- 139 Van der Steen, R., Biesheuvel, P. L., Mathies, R. A. & Lugtenburg, J. Retinal analogs with locked 6-7
conformations show that bacteriorhodopsin requires the 6-s-trans conformation of the chromophore. *J. Am.*
Chem. Soc. **108**, 6410-6411 (1986).
- 140 Houjou, H., Inoue, Y. & Sakurai, M. Physical Origin of the Opsin Shift of Bacteriorhodopsin.
Comprehensive Analysis Based on Medium Effect Theory of Absorption Spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **120**,
4459-4470 (1998).
- 141 Sudo, Y., Yuasa, Y., Shibata, J., Suzuki, D. & Homma, M. Spectral tuning in sensory rhodopsin I from
Salinibacter ruber. *The Journal of biological chemistry* **286**, 11328-11336, doi:10.1074/jbc.M110.187948
(2011).
- 142 Gunaydin, L. A. *et al.* Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci.* **13**, 387-392, doi:10.1038/nn.2495 (2010).
- 143 Lin, J. Y., Knutsen, P. M., Muller, A., Kleinfeld, D. & Tsien, R. Y. ReaChR: a red-shifted variant of
channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat. Neurosci.* **16**, 1499-1508,
doi:10.1038/nn.3502 (2013).
- 144 Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745
(2000).
- 145 Hatanaka, M. *et al.* Trp86 --> Phe replacement in bacteriorhodopsin affects a water molecule near Asp85 and

- light adaptation. *Biochemistry (Mosc)*. **36**, 5493-5498, doi:10.1021/bi970081k (1997).
- 146 Rothschild, K. J. *et al.* Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: evidence for the interaction of
proline-186 with the retinylidene chromophore. *Biochemistry (Mosc)*. **29**, 5954-5960 (1990).
- 147 Kolber, Z. S., Van Dover, C. L., Niederman, R. A. & Falkowski, P. G. Bacterial photosynthesis in surface
waters of the open ocean. *Nature* **407**, 177-179, doi:10.1038/35025044 (2000).
- 148 Venter, J. C. *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74,
doi:10.1126/science.1093857 (2004).
- 149 Schirmer, A. *et al.* Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in
microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**,
4840-4849, doi:10.1128/AEM.71.8.4840-4849.2005 (2005).
- 150 Inoue, K. *et al.* A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nat Commun* **4**, 1678,
doi:10.1038/ncomms2689 (2013).
- 151 Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A. & Elofsson, A. TOPCONS: consensus prediction of membrane
protein topology. *Nucleic Acids Res.* **37**, W465-468, doi:10.1093/nar/gkp363 (2009).
- 152 Chun, E. *et al.* Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled
receptors. *Structure* **20**, 967-976, doi:10.1016/j.str.2012.04.010 (2012).
- 153 Liu, W. *et al.* Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* **337**, 232-236,
doi:10.1126/science.1219218 (2012).
- 154 Thompson, A. A. *et al.* Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic.
Nature **485**, 395-399, doi:10.1038/nature11085 (2012).
- 155 Tan, Q. *et al.* Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*
341, 1387-1390, doi:10.1126/science.1241475 (2013).

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

外部発表

【発表論文】

- 1) Kato, H.E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A.D., Ishitani, R., Deisseroth, K. and Nureki, O. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* 482, 369-374 (2012).
- 2) Kamiya, M., Kato, H.E., Ishitani, R., Nureki, O. and Hayashi, S. Structural and Spectral Characterization of C1C2 Channelrhodopsin and its Mutants by Molecular Simulations. *Chem. Phys. Lett.* 556, 266-271 (2013).
- 3) Tanaka, Y., Hipolito, C.J., Maturana, A.D., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., Katoh, T., Kato, H.E., Hattori, M., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Ishitani, R., and Nureki, O. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* 496, 247-251 (2013).
- 4) Doki, S., † Kato, H.E., † Solcan, N., † Iwaki, M., Koyama, M., Iwase, N., Tsukazaki, T., Sugita, Y., Kandori, H., Newstead, S., Ishitani, R., and Nureki, O. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* Epub ahead of print (2013). (†These authors are equally contributed.)
- 5) Ito, S., Kato, H.E., Taniguchi, R., Nureki, O. and Kandori, H. Water-containing hydrogen-bonding network in the active center of channelrhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* Epub ahead of print, (2014).

【著書】

1. 加藤英明, 石谷隆一郎, 濡木理
光駆動性の陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシンの結晶構造から
その異様イオンの輸送経路と分子機構の一端を解明
ライフサイエンス新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/4321> (2012)
2. 加藤英明, 濡木理
光駆動性陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシンの結晶構造
日本結晶学会誌 54 (4), 220-225 (2012)
3. Kato, H.E., and Nureki, O. Crystal Structure of Channelrhodopsin, a Light-Gated Cation Channel: All Cations Lead through the Monomer, Photon Factory Activity Report 2011 -PartA- highlights #29, p.47 (2012)
4. 加藤英明, 石谷隆一郎, 濡木理
オプトジェネティクス - 光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線 -
1 編 1 章 1 節 チャンネルロドプシンの構造機能解析
理工学系出版社 (株) エヌ・ティー・エス 2013
5. 加藤英明
蛋白質科学会アーカイブ
脂質キュービックフェーズ法 LCP 法 (脂質メソフェーズ法) を利用した膜タンパク質の結晶化
The crystallization of membrane protein using lipidic cubic and sponge phases (lipidic mesophases)
6. Kato, H.E., and Nureki, O. Crystal Structure of Channelrhodopsin, a Light-Gated Cation Channel - All Cations Lead through the Monomer - , *BIOPHYSICS*, 9, 57-61 (2013).

【受賞】

1. 加藤英明 . 平成20年度 理学部学生選抜国際派遣プログラム理学部長賞 受賞
2. 加藤英明 . 平成24年度 日本蛋白質科学会若手奨励賞 受賞 「光駆動性陽イオンチャネルであるチャネルロドプシンの結晶構造解析」
3. 加藤英明 . 第5回 Merck Award for Young Biochemistry Researcher 優秀賞 受賞 「Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel」
4. 加藤英明 . 第3回 日本学術振興会 育志賞 受賞

【発表】

(1) 国際会議における発表

1. (口頭発表 + ポスター) ○**Hideaki Kato**, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andrés Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl Deisseroth and Osamu Nureki Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, Gordon Research Conferences “Ligand Recognition & Molecular Gating”, Ventura, USA, (January 2012)
2. (ポスター) ○**Hideaki Kato**, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andrés Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl Deisseroth and Osamu Nureki Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 15th International Conference on Retinal Proteins (Poster P-20), Ascona, Switzerland, (October 2012)
3. (ポスター) ○**Hideaki Kato**, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andrés Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl Deisseroth and Osamu Nureki Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (Poster P001), Nagoya, Japan, (January 2013)
4. (ポスター) ○**Hideaki Kato**, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andrés Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl Deisseroth and Osamu Nureki Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology (Poster ***), Nagoya, Japan, (May 2013)
5. (ポスター) ○**Hideaki E. Kato**, Mizuki Takemoto, Michio Koyama, Jumpei Ito, Shigehiko Hayashi, Andrés D. Maturana, Karl Deisseroth, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki Structural and computational analyses of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 27th Annual Symposium of the Protein Society (Poster 056), Boston, US, (July 2013)
6. (ポスター) ○**Hideaki E. Kato**, Mizuki Takemoto, Michio Koyama, Jumpei Ito, Shigehiko Hayashi, Andrés D. Maturana, Karl Deisseroth, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki Structural and computational analyses of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, International Symposium Optogenetics 2013 (Poster 001), Mita, Japan, (September 2013)

(2) 国内学会・シンポジウム等における発表

1. (口頭発表+ポスター) ○ 加藤英明, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, 西澤知宏, 平田邦生, 伊藤淳平, 會田祐輔, 塚崎智也, 林重彦, Peter Hegemann, Andrés Maturana, 石谷隆一郎, Karl Deisseroth, 濡木理 X-ray crystallographic analysis of channelrhodopsin, light-gated cation channel, 第34回日本分子生物学会年会 (口頭発表: 2T7pI-6, ポスター: 2P-0299), 横浜, 2011年12月
2. (口頭発表) ○ 加藤英明, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, 西澤知宏, 平田邦生, 伊藤淳平, 會田祐輔, 塚崎智也, 林重彦, Peter Hegemann, Andrés Maturana, 石谷隆一郎, Karl Deisseroth, 濡木理 Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 若手分野関連携プロジェクト冬の会議 in 箱根 6th Circular, 箱根, 2012年1月
3. (口頭発表+ポスター) ○ 加藤英明, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, 西澤知宏, 平田邦生, 伊藤淳平, 會田祐輔, 塚崎智也, 林重彦, Peter Hegemann, Andrés Maturana, 石谷隆一郎, Karl Deisseroth, 濡木理 Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 第12回日本蛋白質科学会年会 (口頭発表: 2SA-05, ポスター: 2P-048), 名古屋, 2012年6月
4. (口頭発表) ○ 加藤英明 “チャンネルロドプシンの構造解析を通じて見る脂質キュービック法, 蛋白研セミナー” 高難度結晶の分解能向上に秘策はあるのか?”, 大阪, 2012年9月
5. (口頭発表+ポスター) ○ 加藤英明, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, 西澤知宏, 平田邦生, 伊藤淳平, 會田祐輔, 塚崎智也, 林重彦, Peter Hegemann, Andrés Maturana, 石谷隆一郎, Karl Deisseroth, 濡木理 Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 第50回日本生物物理学会年会 (口頭発表: 1YS0930, ポスター: 1PT128), 名古屋, 2012年9月
6. (ポスター) ○ 加藤英明, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, 西澤知宏, 平田邦生, 伊藤淳平, 會田祐輔, 塚崎智也, 林重彦, Peter Hegemann, Andrés Maturana, 石谷隆一郎, Karl Deisseroth, 濡木理 Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel, 第4回光操作研究会”動作原理の理解と行動制御への応用”, 岡崎, 2012年9月

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開

インターネット公表に
関する共著者全員の許
可が得られていないた
め、本章については、
非公開